

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-273452

(P2000-273452A)

(43) 公開日 平成12年10月3日 (2000.10.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 9 K 15/06		C 0 9 K 15/06	4 C 0 3 7
A 6 1 P 39/06		A 6 1 K 31/00	6 3 9 C 4 C 0 7 1
A 6 1 K 31/194		31/19	6 0 3 4 C 0 8 6
31/343		31/34	6 0 2 4 C 0 8 8
35/82		35/82	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-79393

(22) 出願日 平成11年3月24日 (1999.3.24)

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 元売 睦美

埼玉県所沢市緑町1-5-3-302

(72) 発明者 青江 誠一郎

埼玉県狭山市新狭山2-8-9 ワコー第

2新狭山マンション406

(72) 発明者 藤田 孝

埼玉県日高市大字高萩450番地15

(74) 代理人 100105061

弁理士 児玉 喜博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化剤

(57) 【要約】

【課題】 活性酸素や過酸化脂質による酸化細胞障害を予防又は改善することができる抗酸化剤の提供。

【解決手段】 コケ植物から抽出するか、又はコーヒー酸もしくはコーヒー酸メチルエステルに各酵素や試薬を反応させた後、酢酸エチルで抽出し、抽出物を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムに通液して精製することによってコーヒー酸二量体を製造し、抗酸化剤の有効成分として使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤。

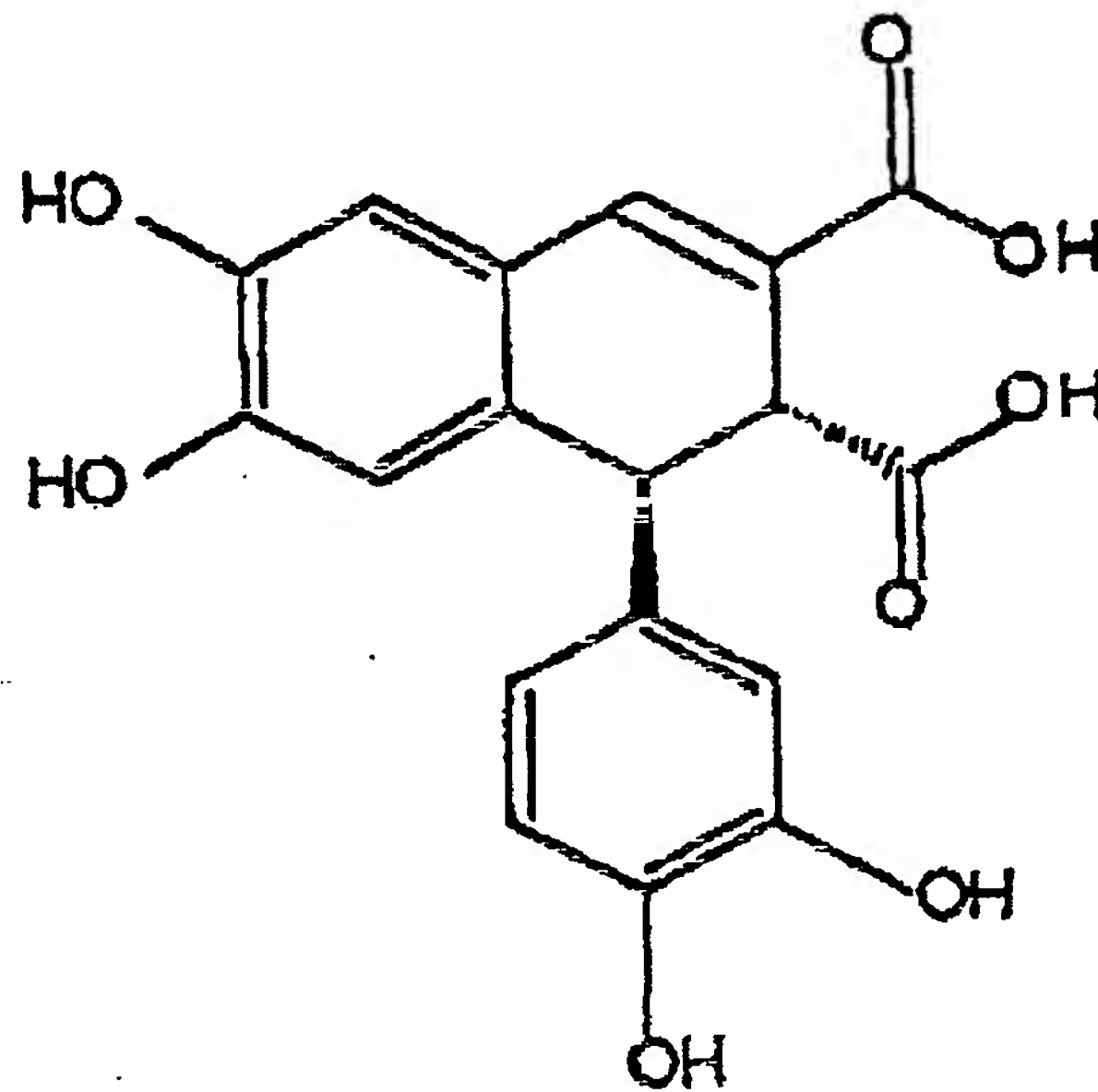
【請求項2】 コーヒー酸二量体が、コケ植物由来である請求項1記載の抗酸化剤。

【請求項3】 コーヒー酸二量体が、酵素、塩化第二鉄

又は過ヨウ素酸ナトリウムを使用して調製されたものである請求項1記載の抗酸化剤。

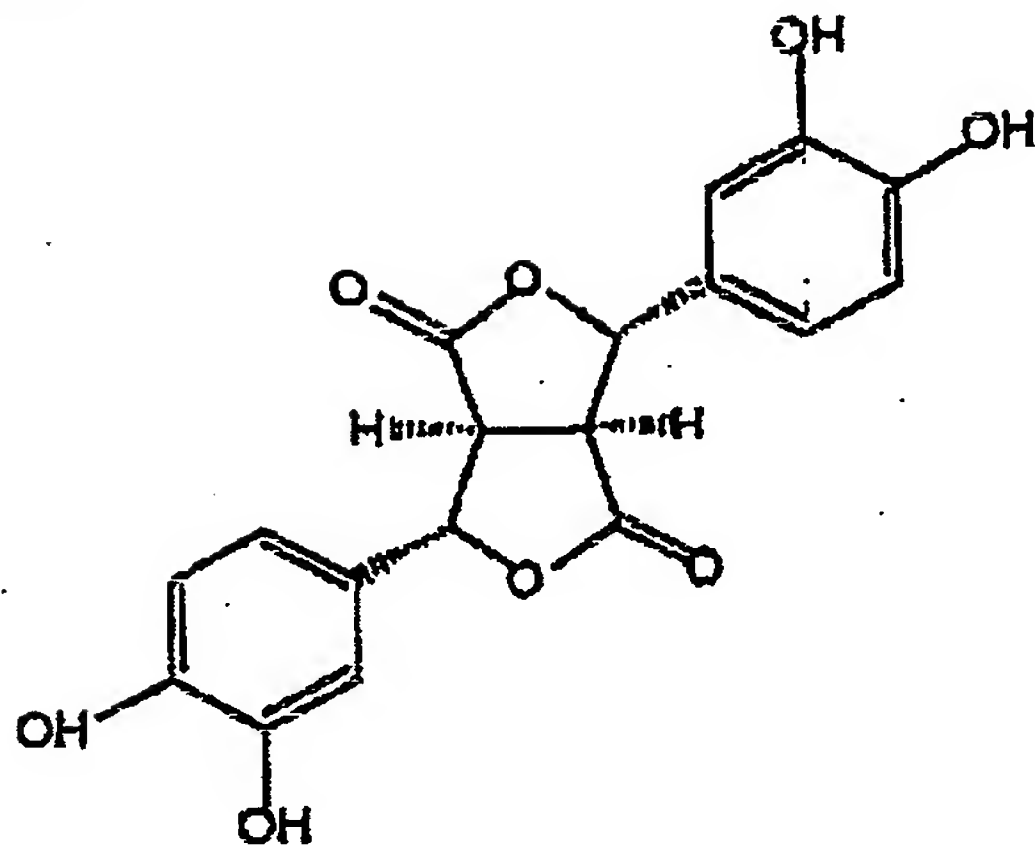
【請求項4】 コーヒー酸二量体が、化学式1、化学式2又は化学式3で示される化合物及び／又はその塩類であることを特徴とする請求項1記載の抗酸化剤。

【化1】



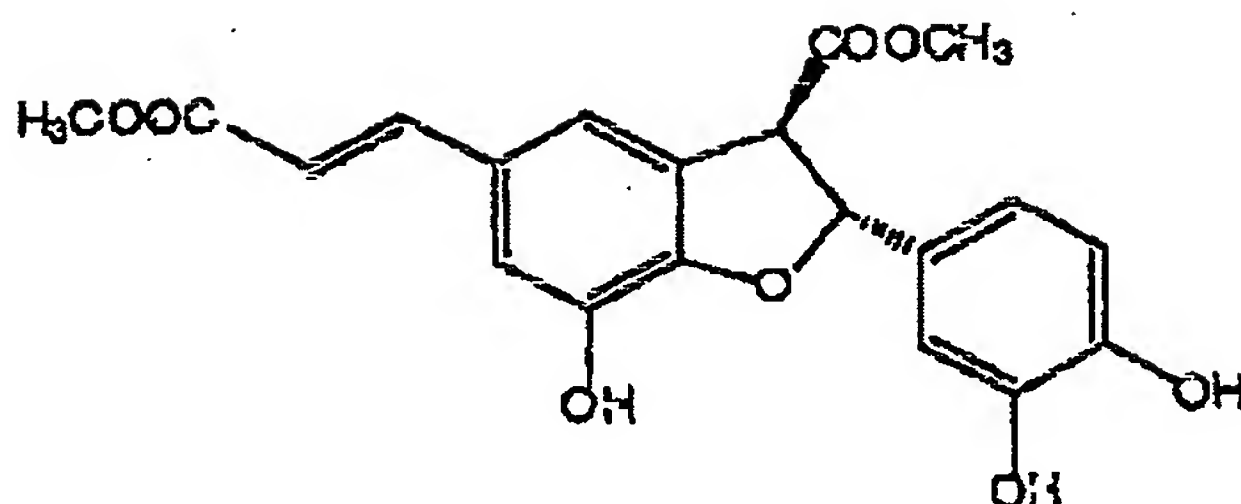
コーヒー酸二量体 (L-1)

【化2】



コーヒー酸二量体 (L-4)

【化3】



### コーヒー酸二量体 (L-5)

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、例えば、コケ植物由来のコーヒー酸二量体や、酵素、塩化第二鉄又は過ヨウ素酸ナトリウムを使用して調製されるコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】人間をはじめとする好気性生物にとって酸素は不可欠であるが、活性酸素と呼ばれる酸素分子由来のフリーラジカルが、生体に障害をもたらすことが知られている。このような活性酸素による細胞や遺伝子の障害は、ガン、糖尿病などの生活習慣病の発生や進行に関係があり、また、老化の原因の一つであるとも言われている。生体内には、脂質の過酸化により生じた種々の酸化障害に対し、酸化抑制酵素、例えばスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼによって過酸化物質を分解し、安定化する機構が存在する。また、これらの酵素による生体防御機構と共に、生体内酸化抑制物質が酸化抑制的防御機構に重要な役割を果たしているものと推定されている。例えば、脂溶性の物質であるビタミンEは、生体膜を物理的に安定化したり、脂質の過酸化過程におけるフリーラジカルの連鎖反応の停止剤として作用するなど、多くの報告がある。また、最近では、食品成分として摂取する天然酸化抑制物質の探索が行われており、ゴマ種子由来のセサモリノール、セサミノール、茶カテキンに含まれるエピガロカテキンガレート、コーヒー酸など、植物由来の成分について多くの研究がなされている。このように、植物中には酸化を抑制する成分が多量に存在することが明らかにされてきているが、コーヒー酸二量体が抗酸化性を有することについては全く報告されていない。

【0003】コーヒー酸は、図に示される構造式を有するものであるが、コーヒー酸を基本単位とした1-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-1,2-dihydro-2,3-naphthalenedicarboxylic acid (DDDN) の形態でコケ植物を含むいくつかの高等植物の中に多量に存在している。DDDNは分子内に2つの不斉炭素有し、維管束植物では

(-)体のみ又はラセミ体として存在している。しかし、コケ類では (+)体又は (-)体の一方のみ存在する。今までにコケ植物のうちウロコゴケ目のアキウロコゴケから、1-(6-carboxy-2-oxo-2H-3-pyranyl)-6,7-dihydroxy-1,2-dihydro-2,3-naphthalenedicarboxylic acid (jamesopyrone)を単離したが、この化合物は、生合成においてはDDDNの芳香環が酸化されて、 $\alpha$ -ピロン環になったものと考えられる。これらのことから、コケ植物は維管束植物におけるリグナンの生合成系とは異なり、コーヒー酸からエナンチオ選択的なカップリング反応を経て、DDDNやjamesopyroneを生合成すると考えられる。

【0004】DDDNの前駆体と考えられるコーヒー酸のような4-ヒドロキシ桂皮酸類は、植物に豊富に含有されており、植物を加工する際、また植物を起源とする食品製造の際に、この反応が起こりうる可能性が考えられる。CilliersとSingleton は、非酵素的にpHを変化させた水溶液で種々の二量体が形成されることを報告している (J.J.L.Cilliers and V.L.Singleton, J. Agric. Food Chem., 39, 1298-1303, 1991)。しかし、酵素や酸化剤を用いて上記のような反応を計画的に制御して二量体を生成させた研究例はない。さらに、コーヒー酸のような単純な化合物が、植物体内や食品中で二量化して生成した二量体化合物の生理活性については知られておらず、特にコーヒー酸二量体の酸化抑制作用の研究については皆無である。

##### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、コーヒー酸二量体を有効成分とする新規な抗酸化剤を提供することを課題とする。

##### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、コーヒー酸二量体の有する生理作用について研究した結果、コーヒー酸二量体が優れた酸化抑制作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。本発明で用いるコーヒー酸二量体は、コケ植物から抽出するか、又は酵素、塩化第二鉄、過ヨウ素酸ナトリウムなどを使用して調製することができる。即ち、コーヒー酸又はコーヒー酸メチ

ルエステルに各試薬を反応させた後、酢酸エチルで抽出し、抽出物を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムに通液して精製する。溶媒は目的とする二量体によって適宜変更すればよい。このようにして、純度95%以上の、図に示される構造式を有するコーヒー酸二量体(L-1、L-4、及びL-5)を得ることができる。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明の抗酸化剤は、例えば、コケ植物から抽出するか、又はコーヒー酸から調製して得られるコーヒー酸二量体を有効成分とする。本発明のコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤は、錠剤、タブレット、粉末などの製剤にして用いることができる。また、本発明のコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤は、飲食品に添加して用いることもできる。本発明のコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤は、ラジカルスカベンジャー活性を有することから、成人一日当たり100 $\mu$ g～1,000mgを一回又は数回に分けて摂取することによって、活性酸素や過酸化脂質による酸化的細胞障害を予防又は改善することができ有用である。次に、本発明のコーヒー酸二量体の調製方法を実施例を挙げて説明する。

#### 【0008】

【実施例1】(トサカゴケからのコーヒー酸二量体の抽出)トサカゴケ(*Lophocolea heterophylla*)カルスの風乾物1gを、メタノール抽出し、抽出物を減圧濃縮後、逆相HPLC(ODS 0.5% $\text{HCOOH}/20\%\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ )で分離精製し、1.3mgのコーヒー酸二量体(L-1)を得た。

#### 【0009】

【実施例2】(酵素法によるコーヒー酸二量体の調製)コーヒー酸を0.4mMの濃度になるようpH7.5のリン酸緩衝液400mlに溶解させ、これに西洋ワサビ由来パーオキシダーゼ(Sigma Type 1、Sigma社製)1mgを加えた。次いで、0.5mMの過酸化水素を加え、1時間反応させた。反応液に1N塩酸を添加してpH3の酸性にした後、分液ロートに移し、ジエチルエーテル80mlで3回繰り返し洗浄した。次いで、水層を酢酸エチル80mlで3回繰り返し抽出した。酢酸エチル抽出液を濃縮乾固させて得られた抽出物を、逆相HPLC(ODS 0.5% $\text{HCOOH}/20\%\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ )によって分離精製し、1.5mgのコーヒー酸二量体(L-1)を得た。

#### 【0010】

【実施例3】(酵素法によるコーヒー酸二量体の調製)100ml容の三角フラスコにコーヒー酸90mg、 $\beta$ -シクロデキストリン570.6mg及び水20mlを入れて加熱溶解し、超音波処理下でアスピレーターで減圧して、脱気した。これに30%過酸化水素水60 $\mu$ l及び西洋ワサビ由来パーオキシダーゼ(Sigma Type 1、Sigma社製)1mgを添加し、30℃で1時間、攪拌しながら反応させた。反応後、希塩酸でpH2の酸性にし、酢酸エチル20mlで3回繰り返し抽出した後、抽出液を減圧濃縮した。得られた濃縮物

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-酢酸エチル(1:1))によって分離精製し、48.9mgのコーヒー酸二量体(L-4)を得た。

#### 【0011】

【実施例4】(塩化第二鉄を用いたコーヒー酸二量体の調製)塩化第二鉄6水和物3.2gを水3.2mlに溶解した塩化第二鉄水溶液を調製した。次に、300ml容の三角フラスコにコーヒー酸1g及びアセトン60mlを入れ、氷冷下で前記の塩化第二鉄水溶液を添加して5時間攪拌して反応させた。次いで、エバポレーターでアセトンを除去した後、水-酢酸エチル(1:1)400mlで分配した。その後、酢酸エチルで3回繰り返し抽出し、得られた抽出物を減圧濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-アセトン(1:1))で分離精製し、120mgのコーヒー酸二量体(L-4)を得た。

#### 【0012】

【実施例5】(過ヨウ素酸ナトリウムを用いたコーヒー酸二量体の調製)300ml容の三角フラスコにコーヒー酸180mg、水100mlを加えて加熱溶解し、放冷した後、過ヨウ素酸ナトリウム214.5mgを添加し、10分間反応させた。反応液を酢酸エチル50mlで3回繰り返し抽出した後、酢酸エチル層を飽和食塩水100mlで洗浄した。次いで、得られた酢酸エチル抽出物を減圧濃縮した。得られた濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-酢酸エチル(1:1))で分離精製し、81mgのコーヒー酸二量体(L-4)を得た。

#### 【0013】

【実施例6】(過ヨウ素酸ナトリウムを用いたコーヒー酸二量体の調製)300ml容のナスフラスコにコーヒー酸メチルエステル100mg、水100mlを入れ、加熱溶解し、超音波処理下でアスピレーターで減圧して脱気し、次いで窒素ガスを通気した。次に、過ヨウ素酸ナトリウム107mgを添加し、20分間反応させた。反応液を酢酸エチル50mlで3回繰り返し抽出した後、酢酸エチル層を飽和食塩水100mlで洗浄した。得られた酢酸エチル抽出物を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-酢酸エチル(4:1))で分離精製し、10.4mgのコーヒー酸二量体(L-5)を得た。次に、本発明の効果を確認した試験例を示す。

#### 【0014】

【試験例1】(コーヒー酸二量体の抗酸化活性)実施例で得られたコーヒー酸二量体の抗酸化活性を、大澤らの方法(J. Agric. Food Chem., Vol. 35, No. 5, p. 809-812, 1987)により測定した。すなわち、ウサギ保存血液と等張液(10mMリン酸緩衝液/152mM NaCl, pH7.4)とを等量混和し、4℃、1,500 $\times$ g(3,500rpm)、20分間の遠心分離を3回行って洗浄した。洗浄された血球に低張液(10mMリン酸緩衝液, pH7.4)をよく混和し、4℃、20,000 $\times$ g(11,000rpm)、40分間の遠心分離を4回行った。得られた緩い沈澱部分(ゴースト)を用いてコーヒー酸二

量体の抗酸化活性を検討した。実施例で得られたコーヒー酸二量体（L-1、L-4及びL-5）を初濃度で0、0.01、0.1、1、10mMとなるように調製し、上記の赤血球膜ゴーストと混合し、酸化剤を加えて酸化反応を行った。対照としては、既知の抗酸化剤であるビタミンEを用いて同様の処理を行なった。次いでTBA反応を行い、532nmで吸光度を測定して酸化生成物を定量した。抗酸化活性の評価は、サンプル無添加での吸光度を100%として、各サンプルを添加したときの吸光度から次式で定義されるゴースト酸化率を算出することで行った。なお、このゴースト酸化率が低いものほどゴーストの酸化が抑制されており、抗酸化活性が高いことを示している。また、吸光度測定に当たっては、対照としてゴースト無添加でTBA反応を行って得られた吸光度をブランク値として吸光度から差し引いた。結果を表1に示す。

【0015】

ゴースト酸化率 (%)

サンプル濃度(mM)	0	0.01	0.1	1	10
ビタミンE	100	93	88	74	59
コーヒー酸	100	82	87	62	35
コーヒー酸二量体(L-1)	100	90	88	50	30
コーヒー酸二量体(L-4)	100	90	84	43	18
コーヒー酸二量体(L-5)	100	80	87	61	15

【0018】次に、本発明のコーヒー酸二量体の利用例を実施例により説明する。

【0019】

【実施例7】（抗酸化剤を配合した飲料の製造）表2に

【数1】ゴースト酸化率(%) = (吸光度/サンプル無添加での吸光度) × 100

【0016】コーヒー酸二量体（L-1、L-4及びL-5）を添加すると、濃度依存的な抗酸化活性を示し、その活性はコーヒー酸よりも高いものであった。以上、本試験例の結果により、コーヒー酸二量体（L-1、L-4及びL-5）には抗酸化活性（ラジカルスカベンジャー活性）が認められ、活性酸素や過酸化脂質による酸化的細胞障害の予防・改善に有用であることがわかった。なお、コーヒー酸二量体は、コーヒー酸と比べ水への溶解性が高いため、飲料等へ利用する場合の適性が良好である。さらに、コーヒー酸二量体は、コーヒー酸と比べ水溶液とした場合の安定性が高く、効果の持続性が良好であり、有用なものである。

【0017】

【表1】

示した配合で原料を混合した後、容器に充填し、加熱滅菌して、酸化抑制作用を付与した飲料を製造した。

【0020】

【表2】

混合異性化糖	15.0 (重量%)
果汁	10.0
クエン酸	0.5
コーヒー酸二量体※	0.0005
香料	0.1
炭酸カルシウム	0.5
水	73.9

※L-1、L-4又はL-5

【0021】

【実施例8】（抗酸化剤を配合した錠剤の製造）表3に示した配合で原料を混合した後、加圧成型して、酸化抑

制作用を付与した錠剤を製造した。

【0022】

【表3】

含水結晶ブドウ糖	93.5 (重量%)
コーヒー酸二量体※	0.005
カルシウム	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

※L-1、L-4又はL-5

【0023】

【実施例9】(抗酸化剤を配合したタブレットの製造)  
表4に示した配合で原料を混合し、酸化抑制作用を付与

したタブレットを製造した。

【0024】

【表4】

コーンスターチ	49.15 (重量%)
含水結晶ぶどう糖	47.34
結晶セルロース	2.5
カルボキシメチルセルロースカルシウム	0.32
コーヒー酸二量体※	0.01
香料	0.68

※L-1、L-4又はL-5

【0025】

【発明の効果】本発明のコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤は、錠剤、タブレット、粉末などの製剤にして用いることができる。また、本発明のコーヒー酸二量体を有効成分とする抗酸化剤は、飲食品に添加して用いることもできる。本発明のコーヒー酸二量体を有効成

分とする抗酸化剤は、ラジカルスカベンジャー活性を有することから、成人一日当たり 100 $\mu$ g ~1,000mg を一回又は数回に分けて摂取することによって、活性酸素や過酸化脂質による酸化的細胞障害を予防又は改善することができ有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
// C 0 7 C 59/52		C 0 7 C 59/52	4 H 0 0 6
C 0 7 D 307/84		C 0 7 D 307/84	4 H 0 2 5
493/04	1 0 1	493/04	1 0 1 C

(72)発明者 田崎 弘之  
北海道帯広市大空町12丁目3番地1 大空  
町住宅401-21

Fターム(参考) 4C037 QA09  
4C071 AA01 CC12 EE05 FF15 GG03  
HH08 JJ01 LL01  
4C086 AA01 AA02 BA06 CA01 GA17  
MA01 MA04 MA09 NA14 ZC21  
4C088 AA17 AC20 BA10 BA11 BA31  
CA06 CA21 CA23 CA25 CA28  
MA01 NA14 ZC21  
4C206 AA01 AA02 DB30 KA18 MA01  
MA04 MA13 MA16 NA14 ZC21  
4H006 AA03 AB83 AC28 AD16 BE36  
BE62 BJ50 BN30 BS30 FC56  
FC74 FE13  
4H025 AA18 AA82 AC04